

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/53098 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. November 1998 (26.11.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/04955		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 10. September 1997 (10.09.97)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 197 21 327.8 21. Mai 1997 (21.05.97) DE 197 39 612.7 9. September 1997 (09.09.97) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BILITEWSKI, Ursula [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). KUHLMEIER, Dirk [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).			
(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).			

(54) Title: METHOD AND KIT FOR DETECTING DNA MUTATIONS USING RESTRICTION ENZYMES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND KIT ZUR DETEKTION VON MUTATIONEN IN DNA'S MIT HILFE VON RESTRIKTIONSENZYMEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for detecting DNA mutations using restriction enzymes. One condition to implement said method is that the cleaving performance of the selected restriction enzyme changes due to mutation. The relevant DNA segment in the genome containing the mutation is multiplied by means of polymerase chain reaction (PCR), wherein the primers used can each be labeled. The first primer enables the segment to be bonded to the surface of the carrier; the label of the second primer is used to enable detection. A restriction enzyme is incubated with the PCR amplicon, wherein the mutated segment is not cleaved if the cleavage site is suppressed by mutation. After the segments are bonded to the surface of the carrier, a detection reaction takes place, wherein the marking label of the second primer is removed in the wild type, insofar as it can be identified in the mutant. A plurality of labels enabling direct or indirect detection is possible. This provides a rapid method for detecting specific mutations in the genome without resorting to complex conventional methods.

(57) Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren beschrieben, das die Möglichkeit bietet, Mutationen in DNA's mit Hilfe von Restriktionsenzymen zu detektieren. Dabei ist Voraussetzung, daß sich durch die Mutation das Schneideverhalten des gewählten Restriktionsenzym verändert. Das relevante DNA-Segment im Genom, das die Mutation enthält, wird mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt, wobei die verwendeten Primer jeweils gelabelt eingesetzt werden. Der erste Primer ermöglicht die Bindung des Segments an eine Trägeroberfläche; das Label des zweiten Primers wird genutzt, um die Detektion zu ermöglichen. Ein Restriktionsenzym wird mit dem PCR-Amplikum inkubiert, wobei das mutierte Segment nicht geschnitten wird, wenn durch die Mutation die Schnittstelle entfällt. Nach der Bindung der Segmente an eine Trägeroberfläche erfolgt eine Detektionsreaktion, wobei der Markierungslabel des zweiten Primers beim Wildtyp entfernt ist, während man ihn bei der Mutante nachweisen kann. Dabei ist eine Vielzahl von Labeln möglich, die eine direkte oder indirekte Detektion erlauben. Damit steht ein schnelles Verfahren zum Nachweis von bestimmten Mutationen im Genom zur Verfügung, ohne auf aufwendige herkömmliche Methoden zurückgreifen zu müssen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren und Kit zur Detektion von Mutationen in DNA's mit Hilfe von Restriktionsenzymen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion von Mutationen von DNA's, wobei eine DNA mittels einer PCR amplifiziert und die Amplikons mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen geschnitten und detektiert werden, dadurch gekennzeichnet, daß zwei markierte Primer eingesetzt werden, wobei die Markierung der ersten Primer zur Bindung der Amplikons an einen oder mehrere Träger und die Markierung der zweiten Primer zur Detektion dient. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung einen Kit zur Durchführung des vorstehend bezeichneten Verfahrens, der dadurch gekennzeichnet ist, daß er zwei markierte Primer umfaßt.

Im Zuge der Aufklärung des menschlichen Genoms zeigt sich die Bedeutung von Gendefekten bei der Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen. So liegen z.B. bei vielen Arten von Krebs, Mukoviszidose, Alzheimer und bei der Entwicklung von Thrombosen Veränderungen in der genetischen Information vor, die u.U. eine Krankheitsentstehung erst ermöglichen. In der medizinischen Diagnostik gewinnt deshalb die Detektion dieser Mutationen immer mehr an Gewicht.

Mutationen werden zur Zeit häufig mit Hilfe der Restriktionsanalyse detektiert. Dabei macht man sich Restriktionsenzyme zunutze, die doppelsträngige DNA sequenzspezifisch erkennen und an entsprechender Stelle schneiden können. Derzeit sind ca. 500 verschiedene Restriktionsenzyme mit über 100 unterschiedlichen Schnittstellen charakterisiert. Diese hohe Spezifität nutzt man zur Detektion der Defekte. Denn häufig liegt eine Mutation, die eine krankhafte Veränderung auslöst, im Bereich einer solchen Schnittstelle eines Enzyms. Durch die Mutation wird die Schnittstelle so verändert, daß der zu untersuchende Strang nicht geschnitten wird. In anderen Fällen entsteht durch eine Mutation erst eine mögliche Schnittstelle für ein Enzym, die vorher nicht vorhanden war.

Zur Standardanalyse wird die zu untersuchende genomische DNA einer Polymerase Kettenreaktion (PCR) unterworfen, mit deren Hilfe ein gewünschtes Stück DNA, auf dem die Mutation liegt, vervielfältigt werden kann. Dazu nutzt man sog. Primer, Sequenzstücke, die den Anfang und das Ende des amplifizierten Stückes DNA festlegen. Des weiteren benötigt man freie Nucleotide, Bausteine der DNA, und die Polymerase, ein Enzym, das die Bildung der zu unter-

suchenden und zu vervielfältigenden DNA-Segmente katalysiert. Zum Ablauf der PCR wird des weiteren ein Thermocycler benötigt, ein Gerät, das das benötigte Temperaturprofil für eine PCR-Reaktion verwirklicht.

Im Anschluß an die Vervielfältigung des zu untersuchenden Segments erfolgt der oben erwähnte Abbau mit Hilfe des Restriktionsenzyms. Dieses schneidet die DNA je nach Mutation unter definierten Bedingungen sequenzspezifisch auf oder es kommt zu keinem Schnitt. Dieser Prozeß kann, je nach Konzentration des Enzyms, einige Stunden in Anspruch nehmen.

Zur Analyse des Produktes verwendet man bisher die Agarose-Gel-elektrophorese: In einer Pufferlösung wird dazu ein Agarosepolymer durch Erhitzen gelöst und nach einer Abkühlphase wird das gelierende Polysaccharid in eine Vorrichtung gegossen, in der die Elektrophorese durchgeführt werden soll. Ist das Gel vollständig abgekühlt, werden die Proben aufgetragen und unter Anlegen einer Potentialdifferenz kommt es zur großenabhangigen Wanderung der DNA-Fragmente in dem Agarosegel.

Die Sichtbarmachung der Fragmente gelingt z.B. unter Zugabe von fluoreszierenden Intercalaten, Substanzen, die sich in die DNA einlagern und unter UV-Licht sichtbar sind. Eine Mutation kann diagnostiziert werden, wenn im Gel eine spezifische Änderung des Restriktionsmusters erkennbar wird.

Zur Detektion einer Mutation dient daher neben der Vervielfältigung des relevanten DNA-Abschnitts eine aufwendige Durchführung von elektrophoretischen Methoden, verknüpft mit der Anfertigung

von Gelen, Auftragen von Proben und entsprechender Wartezeit beim Verlauf der Gelelektrophorese.

Diese Verfahren sind sehr zeitaufwendig, umständlich und damit teuer.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und einen Kit zu entwickeln, mit dem (denen) die vorstehend beschriebenen Mutationsformen einfach, reproduzierbar und mit hohem Probandendurchsatz nachgewiesen werden können, wobei die Nachteile einer Gelelektrophorese vermieden werden.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Detektion von Mutationen von DNA's gelöst, wobei eine DNA mittels einer PCR amplifiziert und die Amplikons mit einem oder mehreren Restriktionszymen geschnitten und detektiert (analysiert) werden, welches Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß zwei markierte Primer eingesetzt werden und die Markierung der ersten Primer zur Bindung der Amplikons (vervielfältigte DNA-Segmente) an einen oder mehrere Träger und die Markierung der zweiten Primer zur Detektion (Analyse) dient.

Die bei diesem Verfahren eingesetzte PCR kann wie üblich durchgeführt werden, wobei als Primer die vorstehend bezeichneten Primer verwendet werden.

Vorzugsweise werden erfindungsgemäß solche Träger verwendet, die auch unter den Bedingungen einer PCR eine Bindung der ersten Primer ermöglichen. Als besonders vorteilhaft haben sich dabei Träger erwiesen, die eine aktivierte Oberfläche aufweisen, wie z.B.

die entsprechend behandelte Oberfläche des Reaktionsgefäßes oder eine Mikrotiterplatte.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden die ersten Primer vor, während oder nach der PCR teilweise oder vollständig an den Trägern fixiert, während die zweiten Primer vorzugsweise frei bzw. nicht an den Träger gebunden und gegebenenfalls im Überschuß in der Reaktionslösung vorliegen. Die Primer können der Reaktionslösung gleichzeitig oder nacheinander zugesetzt werden.

Die zweiten Primer sollen vorzugsweise Label aufweisen, die bei einer Detektion leicht durch übliche Verfahren nachgewiesen werden können.

Erfindungsgemäß können ein oder mehrere Restriktionsenzyme vor, während oder nach der Bindung der DNA-Segmente (Amplikons aus der PCR) an die Träger zugesetzt werden, wobei die Zugabe nach der Bindung bevorzugt wird. Erfindungsgemäß können die Restriktionsenzyme mit den Amplikons inkubiert werden.

Als Restriktionsenzyme können alle bekannten Restriktionsenzyme eingesetzt werden, wobei es natürlich von der zu schneidenden Sequenz abhängt, welche(s) Enzym(e) im konkreten Fall verwendet wird (werden).

Nach der Bindung der Amplikons mittels der ersten Primer an geeignete Träger und vor und/oder nach dem Schneiden, bevorzugt nach dem Schneiden der Amplikons mit einem oder mehreren der vorstehend bezeichneten Restriktionsenzyme können die Amplikons mit einem geeigneten Spülmittel, wie z.B. gegebenenfalls entionisier-

tem oder destilliertem Wasser, das gegebenenfalls Additive wie Puffer enthält, gespült werden. Bei dem nach dem Schneiden erfolgenden Spülen werden geschnittene, nicht fixierte Segmente entfernt.

6

Erfindungsgemäß werden die Detektionsverfahren so ausgewählt, daß die jeweils gewählte Markierung (der Label) der zweiten Primer detektiert werden kann. Dabei kann die Detektion entsprechend der Markierung der zweiten Primer direkt oder indirekt erfolgen.

Es gibt eine Vielzahl von möglichen Verfahren der biochemischen Analytik, die aus der praktischen Anwendung bekannt sind:

1. Kopplung mit spektroskopisch direkt nachweisbaren Substanzen.
2. Markierung mit Enzymlabeln, die ihr Substrat in photochemisch detektierbare Substanzen umwandeln. Von Vorteil ist dabei die damit verbundene Verstärkung des Meßsignals.

Gemäß einer ersten Ausführungsform (s. **Schema 1**) wird zunächst eine Amplifizierung der DNA vorgenommen und die Amplikons dann an einen geeigneten Träger gebunden, wobei das Label am ersten Primer als Kopplungsmediator dient. Gegebenenfalls können die ersten Primer auch mehrere entsprechende Label aufweisen.

Gemäß einer zweiten Ausführungsform (s. **Schema 2**) der vorliegenden Erfindung werden die ersten Primer zunächst an einen geeigneten Träger wie an die Trägeroberfläche des Gefäßes gebunden, in dem die PCR-Reaktion abläuft. Dabei ist eine Kopplungsmethode zu wählen, die den Randbedingungen der PCR, wie z.B. der Temperaturstabilität, genügt. Die Reaktion läuft anschließend nach Stan-

7

dardbedingungen, wobei der zweite Primer nicht an den Träger gebunden ist und im Verhältnis zum ersten Primer vorzugsweise im Überschuß vorliegt.

Während der Reaktion wird das gewünschte DNA-Segment in der Lösung gebildet, jedoch findet Hybridisierung und Amplifikation auch an der Oberfläche des Trägers statt, initiiert durch den gebundenen Primer. Man erhält nach Ende der PCR die gewünschten Produkte, die direkt am Träger gebunden sind. In einem Spülsschritt werden überschüssige PCR-Edukte (z.B. freie Nucleotide etc.) und nicht gebundene Produkte entfernt. Anschließend erfolgt die Spaltung des Segments durch das Enzym, gegebenenfalls ein weiterer Spülsschritt und die wie vorstehend beschriebene Detektion.

Beispielsweise kann man beim **Schema 1** mit Biotin labeln. Im Schritt 3 dieses Schemas könnte man dann die Kopplung an den Träger, beispielsweise eine Mikrotiterplatte, über ein Biotin-bindendes Protein vornehmen, beispielsweise über Streptavidin oder Avidin, das auf der Trägeroberfläche adsorbiert oder kovalent gebunden würde, beispielsweise auf der Oberfläche der Wells der Mikrotiterplatte. Mit Streptavidin gecoatete Mikrotiterplatten sind im Handel erhältlich (Boehringer Mannheim).

Bei **Schema 2** könnte für Primer 1 eine kovalente Kopplung an den Träger vorgesehen werden, beispielsweise an einer Mikrotiterplatte. Dazu sind beispielsweise phosphorylierte Primer geeignet, die in einer Carbodiimid-Reaktion mit entsprechend aktivierten Trägern reagieren könnten. Ein Beispiel für geeignete funktionelle Gruppen des Trägers, beispielsweise der Mikrotiterplatten,

wären Aminogruppen. Auch derartige Mikrotiterplatten sind im Handel erhältlich.

Bei Schema 1 und bei Schema 2 können die gleichen Label für Primer 2 verwendet werden. Beispiele dafür sind Fluorescein, Fluorescein-Derivate, Rhodamin, Rhodamin-Derviate, Cy5 (Fluoreszenzfarbstoff), Cy3 (Fluoreszenzfarbstoff) oder Verbindungen, die indirekt nachweisbar sind.

Fluoreszenzfarbstoffe: bei diesen Primern kann ein direkter anschließender Nachweis mit einem geeigneten Fluorimeter durchgeführt werden.

Digoxin: der indirekte Nachweis kann durch Zugabe eines (enzymmarkierten) Antikörpers geführt werden.

Biotin: der indirekte Nachweis kann durch Zugabe eines Avidin/Enzym-Konjugates geführt werden, beispielsweise durch Zugabe von Avidin bzw. Streptavidin.

Die Bindung des jeweiligen Erkennungsproteins (Antikörper bzw. (Strept)Avidin) kann entweder wie bei sonstigen Mikrotiterplatten-Assays üblich, über Zugabe geeigneter Enzymsubstrate nachgewiesen werden, wobei Peroxidase oder alkalische Phosphatase geeignete Enzyme darstellen (Enzymreaktion liefert farbige Produkte), oder aber sie kann dann, wenn die Kopplung nicht an Mikrotiterplatten, sondern auf geeignete Meßfühler erfolgt, direkt verfolgt werden. Als geeignete Meßfühler können beispielsweise planare Wellenleiter genannt werden, wie sie aus der Biosensorik bekannt sind, und an denen die gleichen Kopplungsreaktionen mit Hilfe von Primer 1 durchgeführt werden können, wie sie vorstehend für Mikrotiterplatten beschrieben worden sind.

Erfindungsgemäß kann die zu untersuchende DNA als Wildtyp oder als Mutante eine Schnittstelle aufweisen.

a) Die Schnittstelle liegt bei intakter DNA (Wildtyp) vor:

Tritt eine Mutation in dem relevanten Bereich der DNA auf, wird die Schnittstelle in dem gewählten Beispiel entfernt. Eine Punktmutation reicht dabei aus, um zu verhindern, daß das Enzym das Segment spezifisch erkennt und schneidet. Durch einen Spülsschritt können vor der eigentlichen Detektion das Restriktionsenzym, PCR-Edukte und gegebenenfalls abgetrennte PCR-Produkte, die das nachweisbare Label enthalten, entfernt werden.

Im Detektionsschritt wird analysiert, ob das Label vorhanden ist oder nicht. Liegt eine Mutation vor, ist das detektierbare Label vorhanden und man erhält je nach gewählter Markierung eine Reaktion. Im Falle einer Enzymmarkierung würde man z.B. eine katalysierte Farbreaktion beobachten. Liegt keine Mutation vor, kann das Enzym spezifisch schneiden und das Label wird entfernt. Man erhält kein detektierbares Signal.

b) Die Schnittstelle liegt bei mutierter DNA vor:

Tritt eine Mutation in dem relevanten Bereich der DNA auf, wird die Schnittstelle in dem gewählten Beispiel erzeugt. Eine Punktmutation kann dabei ausreichen, daß das Enzym das Segment spezifisch erkennt und schneidet. Durch einen Spülsschritt können vor der eigentlichen Detektion das Restriktionsenzym, PCR-Edukte und gegebenenfalls abgetrennte PCR-Produkte, die das nachweisbare Label enthalten, entfernt werden.

Im Detektionsschritt wird analysiert, ob das Label vorhanden ist oder nicht. Liegt eine Mutation vor, ist das detektierbare Label nicht vorhanden und man erhält keine Reaktion. Liegt keine Mutation vor, kann das Enzym nicht schneiden und das Label wird auch nicht entfernt. Man erhält ein detektierbares Signal.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Abbildungen für den Fall a) erläutert:

Schema 1 verdeutlicht den Ablauf des ersten, erfindungsgemäßen Assayaufbaus. Fig. 1 zeigt die Amplifizierung des Targets mit Hilfe der markierten Primer. Die PCR wird in dafür geeigneten Be- hältnissen durchgeführt. Fig. 2 zeigt die PCR-Reaktionsprodukte, die mit Labeln markiert sind. Das eine Ende der Reaktionsprodukte weist eine Markierung auf, die der späteren Bindung an eine Trä- geroberfläche dient und das Label an dem anderen Ende dient der Detektion. Die gesuchte Sequenz, die eine potentielle Mutation enthalten kann, befindet sich innerhalb der amplifizierten Seg- mente.

Fig. 3 zeigt die Bindung der Segmente, ermöglicht durch die erste Markierung; in Fig. 4 wird durch Einwirkung eines Restriktionsen- zyms untersucht, ob die Schnittstelle dieses Enzyms durch eine Mutation entfernt wurde oder nicht. Ist eine Mutation vorhanden, wie in Fig. 5 dargestellt, entfällt die Schnittstelle und die de- tektierbaren Label werden nicht entfernt. Liegt keine Mutation vor, kann das Enzym schneiden. Durch einen einfachen Waschschritt wird das abgetrennte Segment entfernt und man erhält folglich kein Signal am gebundenen Teil des Segments.

Schema 2 demonstriert den zweiten, erfindungsgemäßen Aufbau des Assays. Fig. 1 zeigt, daß ein Teil des ersten Primers, der zur Bindung an die Trägeroberfläche dient, bereits vor Beginn der PCR gebunden vorliegt. Der zweite Primer, der detektierbar ist, liegt in der Lösung im Überschuß vor. Fig. 2 deutet an, daß nach beendeter PCR-Reaktion das Amplikon, das die zu untersuchende Sequenz enthält, oberflächenfixiert vorliegt. Anschließend wird in das-selbe Restriktionsenzym addiert (Fig. 3), welches, wie oben be-schrieben, den Wildtyp schneidet, die Mutationssequenz jedoch nicht. In Fig. 4 ist das Ergebnis des durchgeföhrten Assays ver-deutlicht. Nach einem Waschschritt (nicht gezeigt) ist das detek-tierbare Label im Falle einer Mutation noch am fixierten Segment vorhanden. Beim Wildtyp erhält man jedoch kein Signal, da das En-zym aufgrund der vorhandenen Schnittstelle schneiden und als Folge dessen das abgetrennte, gelabelte Segment durch einen Waschschritt entfernt werden kann.

Erfindungsgemäß wird ein Kit zur Durchführung der vorstehend of-fenbarten Verfahren bereitgestellt, der dadurch gekennzeichnet ist, daß er zwei markierte Primer umfaßt, wobei er vorzugsweise zusätzlich freie Nukleotide und eine Polymerase enthält.

Dabei ist der erste Primer zur Bindung von PCR-Reaktionsprodukten an einen oder mehrere Träger geeignet und dient der zweite Primer der Detektion, wobei der Träger vorzugsweise eine aktivierte Oberfläche umfaßt.

Das erfindungsgemäße Verfahren und der erfindungsgemäße Kit wei-sen folgende Vorzüge gegenüber dem Stand der Technik auf:

- die beschriebenen Ausführungsformen ermöglichen eine Zeiter-sparnis gegenüber der Gelelektrophoretischen Detektion. Besonders die zweite Ausführungsform weist Vorteile auf, da die PCR und die Analyse der Produkte in einem Behälter ablaufen. Damit ist kein Umpipettieren mehr nötig; die Handhabung der Proben wird verein-facht und damit verknüpfte Fehlerquellen ausgeschaltet.
- Je nach Wahl des nachzuweisenden Labels erfolgt die Detektion der Mutation sofort nach der Spaltung durch das Enzym und nicht erst nach erfolgter Gelelektrophorese.
- In der klinischen Anwendung von Testverfahren hat man es häufig mit einem hohen Probenaufkommen zu tun. Der Aufwand zur Durchfüh-rung von Gelelektrophoresen zur Bewältigung der Probenmenge ist entsprechend groß. Da die neue Methode gänzlich im Mikrotiter-plattenformat durchführbar ist, können in vorteilhafter Weise z.B. 96 bzw. 384 Proben parallel vermessen werden.
- Bei der Gelelektrophorese arbeitet man mit toxischen DNA-Einla-gerungsverbindungen, auf die bei der neuen Methode gänzlich ver-zichtet werden kann.

Beispiel 1

Die Mutation im Protein Faktor V wird für ein erhöhtes Thrombose-Risiko verantwortlich gemacht, da sie den Abbau des Glykoproteins Faktor V durch die Serinprotease APC (aktiviertes Protein C) in-hibiert. Der menschliche Faktor V ist ein Glykoprotein von 330 kDa, das mit APC spezifische Wechselwirkungen eingeht und

normalerweise von APC an einer ganz bestimmten Stelle in der Sequenz gespalten wird: beim menschlichen Protein hinter Arg 506 (Arginin als 506. Aminosäure im Protein). Bei Sequenzuntersuchungen im zugehörigen Gen wurde gefunden, daß in der Nukleotidsequenz der Austausch von 1,691 G (G = Guanin) gegen A (Adenin) mit einem erhöhten Thrombose-Risiko korreliert. Diese Mutation führt dazu, daß in dem Protein das Arg 506 (Produkt der Nukleotidsequenz CGA) durch Glutamin (Gln als Produkt der Nukleotidsequenz CAA) ersetzt ist und damit die oben beschriebene Spaltung durch die Protease nicht mehr stattfindet. Zum Nachweis dieser Mutation werden Primer verwendet, mit denen über eine PCR-Reaktion ein Bereich des Gens vervielfältigt wird, der die entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt. Dabei wurden zum Beispiel Fragmente von 267 Basenpaaren Länge erhalten. Durch Behandlung mit dem Restriktionsenzym *Mn*II entstehen daraus 3 Fragmente mit von 67, 37 und 163 Basenpaaren (bp), wenn an der Stelle 1,691 Guanin vorliegt, da das Enzym aufgrund seiner Sequenzspezifität an 2 Stellen eine Spaltung des Genfragmentes durchführen kann (nach 67 bp und nach weiteren 37 bp). Bei Vorliegen der Mutation zu Adenin entfällt die zweite Spaltstelle, so daß nur noch zwei Spaltprodukte beobachtet werden (67 bp und 200 bp Länge), da durch die Mutation sich die Sequenz so geändert hat, daß das verwendete Enzym nicht mehr wirken kann. Der Nachweis der verschiedenen Fragmente erfolgt mit Hilfe der Gelelektrophorese. Diese Informationen wurden im wesentlichen der Publikation von R.M. Bertina et al., Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C, *Nature*, 369, 1994, 64-67 entnommen.

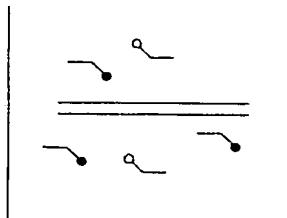
Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion von Mutationen von DNA_s, wobei eine DNA mittels einer PCR amplifiziert und die Amplikons mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen geschnitten und detektiert werden, **dadurch gekennzeichnet**, daß zwei markierte Primer eingesetzt werden, wobei die Markierung der ersten Primer zur Bindung der Amplikons an einen oder mehrere Träger und die Markierung der zweiten Primer zur Detektion dient.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß Träger verwendet werden, an die die ersten Primer auch unter den Bedingungen einer PCR gebunden werden können.
3. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Träger eine aktivierte Oberfläche aufweisen.
4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die ersten Primer vor, während oder nach der PCR teilweise oder vollständig an den Trägern fixiert werden und die zweiten Primer gegebenenfalls frei in der Reaktionslösung vorliegen.
5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein oder mehrere Restriktionsenzyme vor, während oder nach der Bindung der Amplikons an die Träger zugesetzt werden.

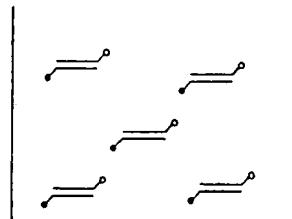
6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Restriktionsenzyme mit den Amplikons inkubiert werden.
7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß nach dem Schneiden mit den Restriktionsenzymen gegebenenfalls gespült wird und die Markierungen der zweiten Primer detektiert werden.
8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Detektionsverfahren entsprechend der Markierung der zweiten Primer ausgewählt wird.
9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß zunächst eine Amplifizierung und dann eine Bindung der Amplikons an einen geeigneten Träger durchgeführt wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß zunächst die ersten Primer an einen geeigneten Träger gebunden und dann mit dem zweiten Primer eine Amplifizierung der DNA durchgeführt wird.
11. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Detektion entsprechend der Markierung der zweiten Primer direkt oder indirekt erfolgen kann.
12. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß er zwei markierte Primer umfaßt.

13. Kit nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß er zusätzlich freie Nukleotide, eine Polymerase und mindestens ein Restriktionsenzym umfaßt.
14. Kit nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die ersten Primer zur Bindung von PCR-Reaktionsprodukten an einen oder mehrere Träger geeignet sind und die zweiten Primer der Detektion dienen.
15. Kit nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß er einen geeigneten Träger, vorzugsweise mit einer aktivierten Oberfläche umfaßt.
16. Verwendung eines Kits nach einem der Ansprüche 11 bis 15 zur Detektion von Mutationen.

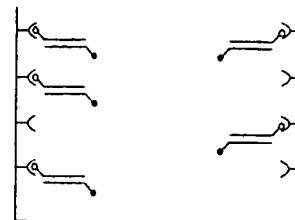
Schema 1



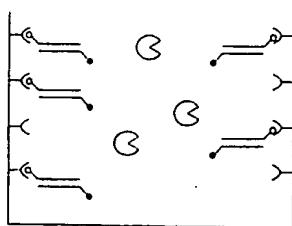
1 PCR-Reaktion



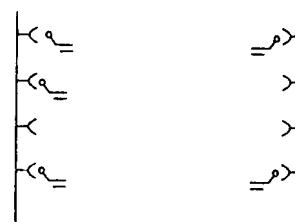
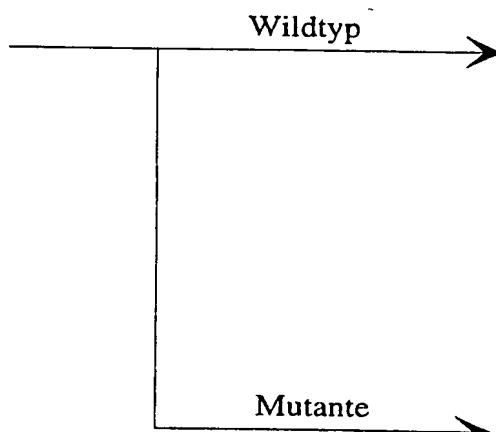
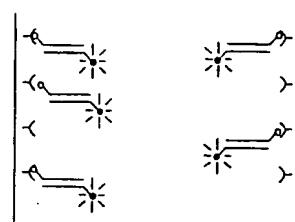
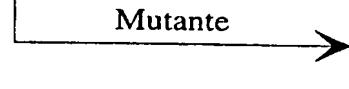
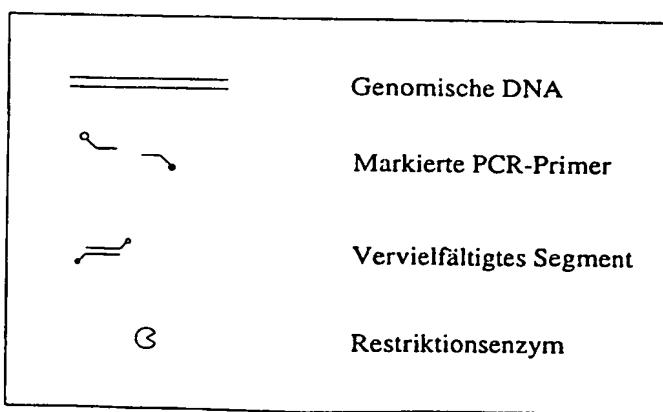
2 amplifiziertes Target



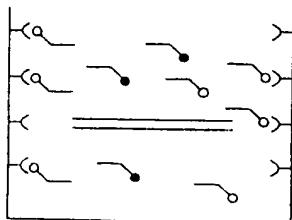
3 Kopplung



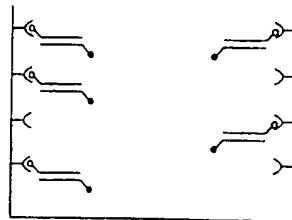
4 Restriktion

5a Detektion:
kein Signal5b Detektion:
Signal

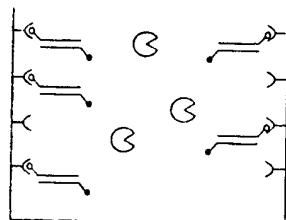
Schema 2



1 PCR-Reaktion

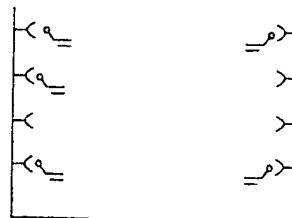


2 amplifiziertes Target



3 Restriktion

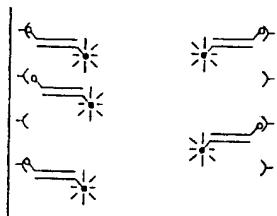
Wildtyp



4a Detektion :

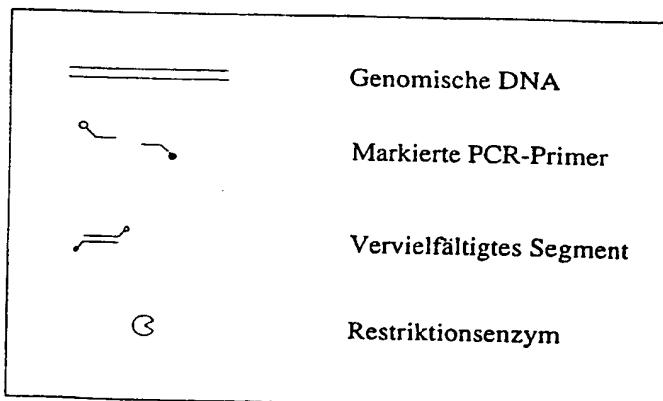
kein Signal

Mutante



4b Detektion :

Signal



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 97/04955

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 25538 A (GEN HOSPITAL CORP ;UNIV LELAND STANFORD JUNIOR (US); AUSUBEL FREDE) 28 September 1995 see claim 1; figure 1 ---	1-13
Y	WO 91 17262 A (UNIV BRITISH COLUMBIA) 14 November 1991 see the whole document ---	1-13
Y	WO 97 09444 A (AVITECH DIAGNOSTICS INC) 13 March 1997 see claim 1; figure 1 ---	1-13
Y	FR 2 718 461 A (CIS BIO INT) 13 October 1995 see the whole document ---	1-13
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- & document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 January 1998	05/02/1998
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Osborne, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/04955

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 360 940 A (CHIRON CORP) 4 April 1990 see claims 1-6 -----	1-13
A	WO 96 36731 A (UNIV BOSTON) 21 November 1996 see the whole document -----	1-13
A	WO 96 35809 A (AVITECH DIAGNOSTICS INC) 14 November 1996 see the whole document -----	1-13
A	EP 0 664 339 A (WAKUNAGA SEIYAKU KK) 26 July 1995 see the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Ref. Application No.

CT/EP 97/04955

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9525538 A	28-09-95	AU 2187295 A		09-10-95
		EP 0812211 A		17-12-97
WO 9117262 A	14-11-91	AU 7777091 A		27-11-91
		CA 2062943 A		31-10-91
		GB 2249627 A,B		13-05-92
WO 9709444 A	13-03-97	AU 6904696 A		27-03-97
FR 2718461 A	13-10-95	NONE		
EP 0360940 A	04-04-90	US 5118605 A		02-06-92
		AT 133714 T		15-02-96
		DE 3854969 D		14-03-96
		DE 3854969 T		30-05-96
		EP 0703296 A		27-03-96
		ES 2083955 T		01-05-96
		JP 2092300 A		03-04-90
		US 5258506 A		02-11-93
		US 5545730 A		13-08-96
		US 5578717 A		26-11-96
		US 5552538 A		03-09-96
		US 5430136 A		04-07-95
		US 5367066 A		22-11-94
		US 5380833 A		10-01-95
WO 9636731 A	21-11-96	AU 6248696 A		29-11-96
WO 9635809 A	14-11-96	AU 5675896 A		29-11-96
EP 0664339 A	26-07-95	US 5688643 A		18-11-97
		CA 2143428 A		19-01-95
		WO 9502068 A		19-01-95

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
EP 97/04955

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 25538 A (GEN HOSPITAL CORP ;UNIV LELAND STANFORD JUNIOR (US); AUSUBEL FREDE) 28.September 1995 siehe Anspruch 1; Abbildung 1 ---	1-13
Y	WO 91 17262 A (UNIV BRITISH COLUMBIA) 14.November 1991 siehe das ganze Dokument ---	1-13
Y	WO 97 09444 A (AVITECH DIAGNOSTICS INC) 13.März 1997 siehe Anspruch 1; Abbildung 1 ---	1-13
Y	FR 2 718 461 A (CIS BIO INT) 13.Oktober 1995 siehe das ganze Dokument ---	1-13
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :	
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert. aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist	"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindnischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)	"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindnischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht	"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
12.Januar 1998	05/02/1998
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Osborne, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PT/EP 97/04955

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 360 940 A (CHIRON CORP) 4.April 1990 siehe Ansprüche 1-6 ---	1-13
A	WO 96 36731 A (UNIV BOSTON) 21.November 1996 siehe das ganze Dokument ---	1-13
A	WO 96 35809 A (AVITECH DIAGNOSTICS INC) 14.November 1996 siehe das ganze Dokument ---	1-13
A	EP 0 664 339 A (WAKUNAGA SEIYAKU KK) 26.Juli 1995 siehe das ganze Dokument -----	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Interp. des Aktenzeichen
EP 97/04955

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9525538 A	28-09-95	AU 2187295 A EP 0812211 A	09-10-95 17-12-97
WO 9117262 A	14-11-91	AU 7777091 A CA 2062943 A GB 2249627 A, B	27-11-91 31-10-91 13-05-92
WO 9709444 A	13-03-97	AU 6904696 A	27-03-97
FR 2718461 A	13-10-95	KEINE	
EP 0360940 A	04-04-90	US 5118605 A AT 133714 T DE 3854969 D DE 3854969 T EP 0703296 A ES 2083955 T JP 2092300 A US 5258506 A US 5545730 A US 5578717 A US 5552538 A US 5430136 A US 5367066 A US 5380833 A	02-06-92 15-02-96 14-03-96 30-05-96 27-03-96 01-05-96 03-04-90 02-11-93 13-08-96 26-11-96 03-09-96 04-07-95 22-11-94 10-01-95
WO 9636731 A	21-11-96	AU 6248696 A	29-11-96
WO 9635809 A	14-11-96	AU 5675896 A	29-11-96
EP 0664339 A	26-07-95	US 5688643 A CA 2143428 A WO 9502068 A	18-11-97 19-01-95 19-01-95